



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **Rb20235-C5** EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Resultados microsatélites

Anexo 5: Ausencia de los transgenes de reprogramación

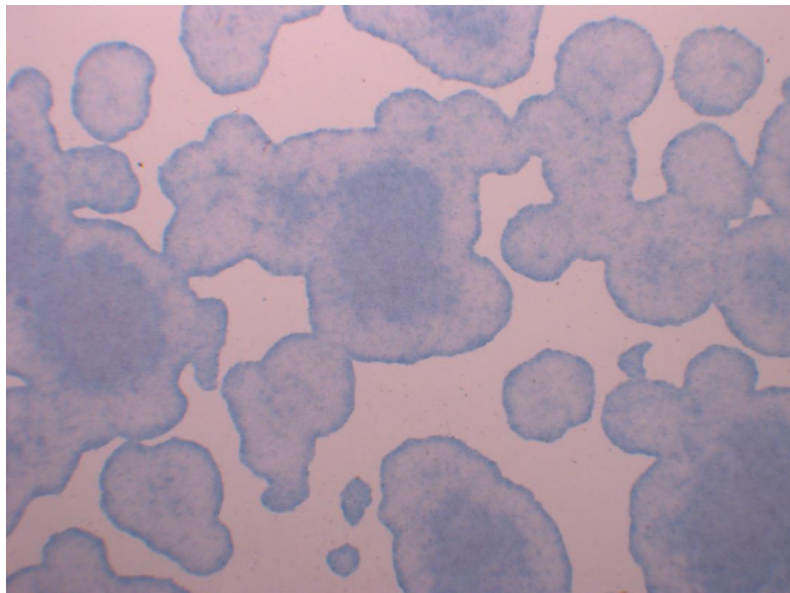
Anexo 6: Presencia de la mutación de las células originales

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

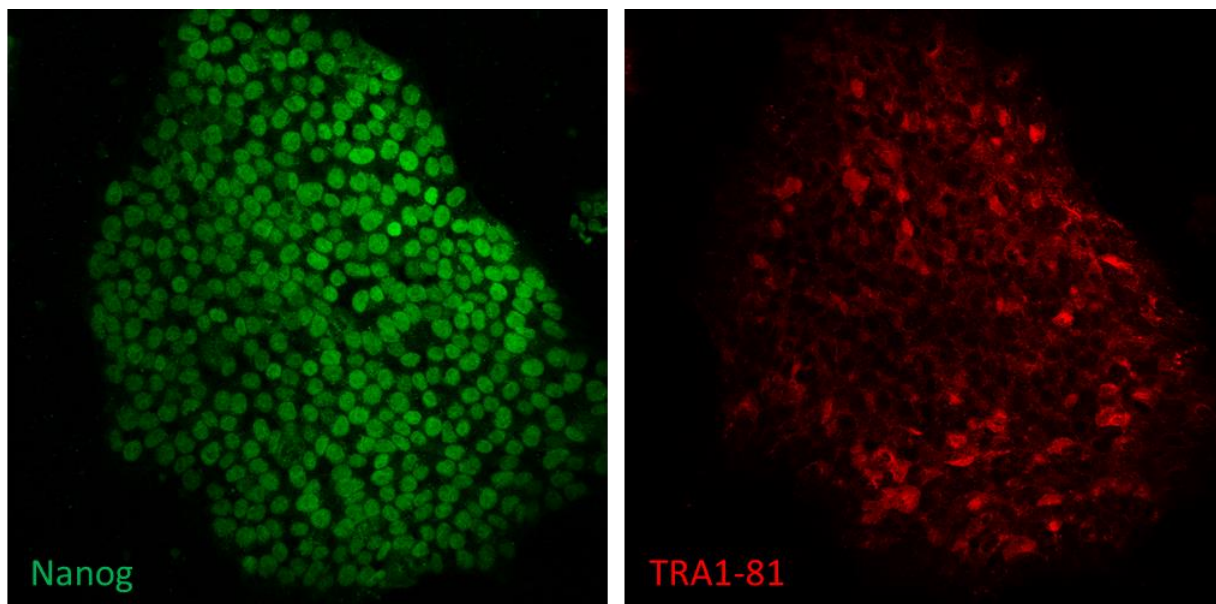


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

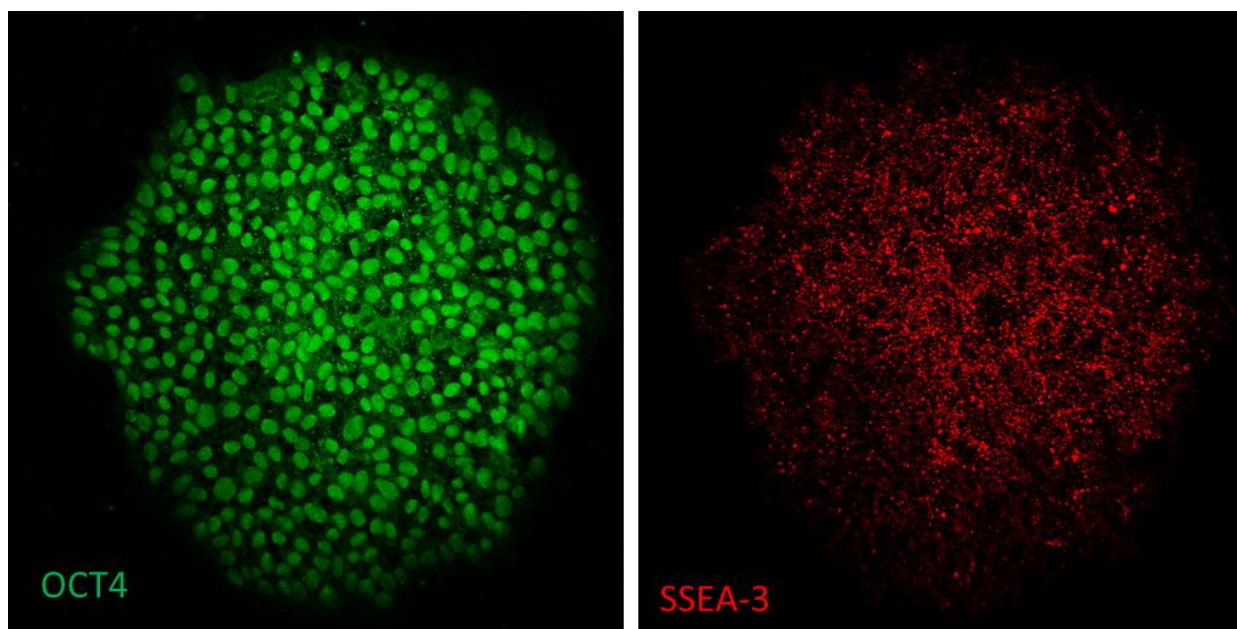


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



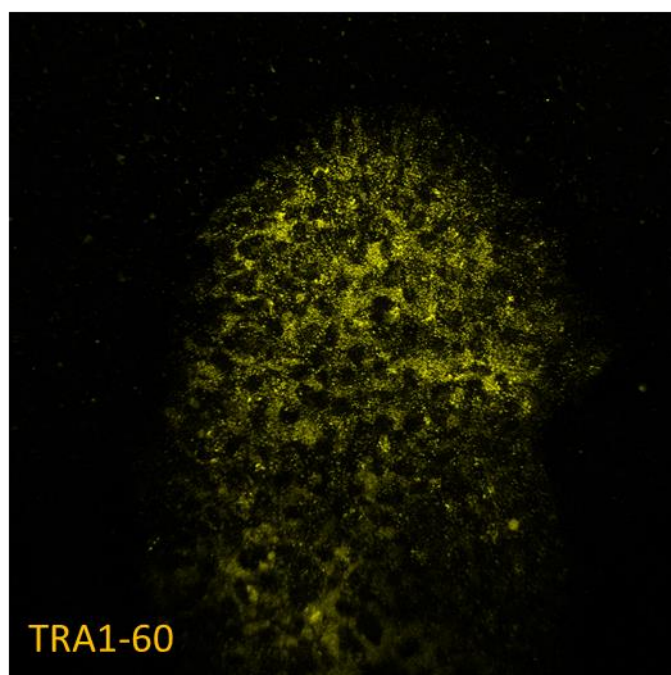
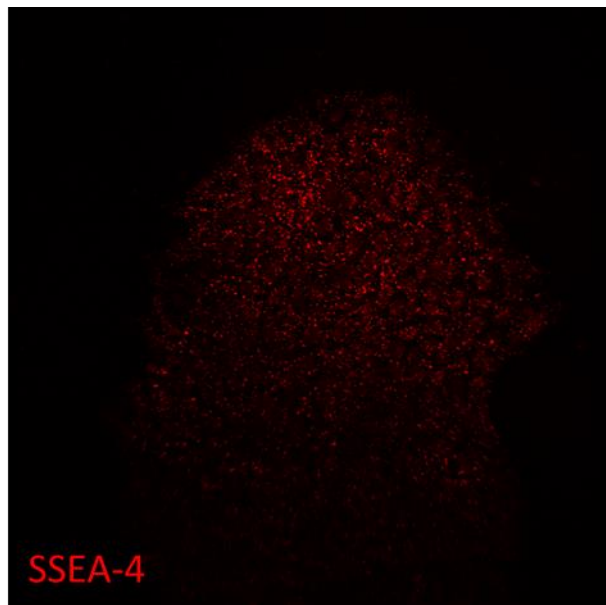
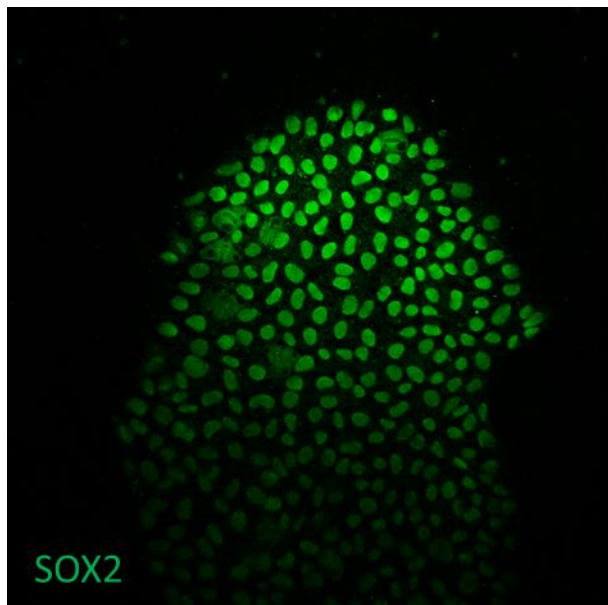
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

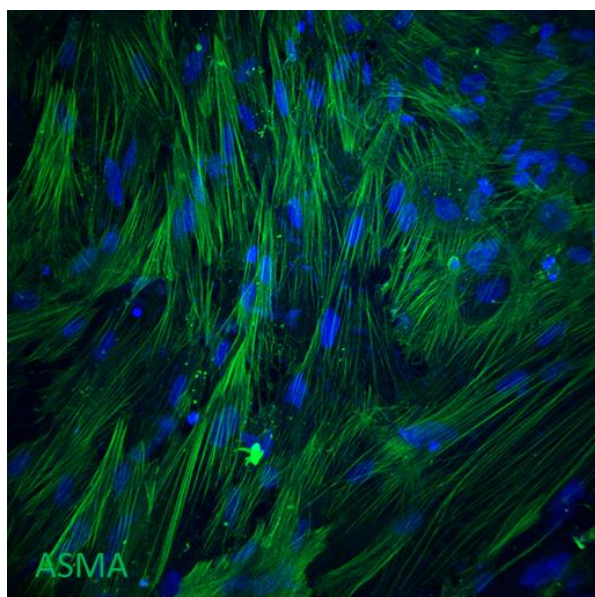


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

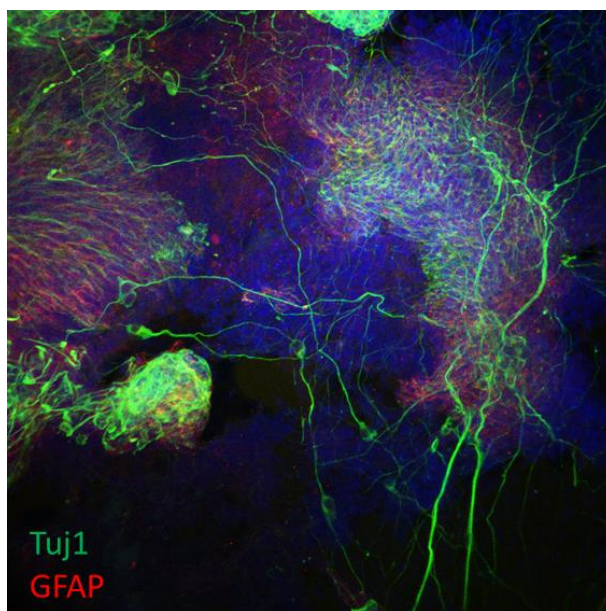


Anexo 2

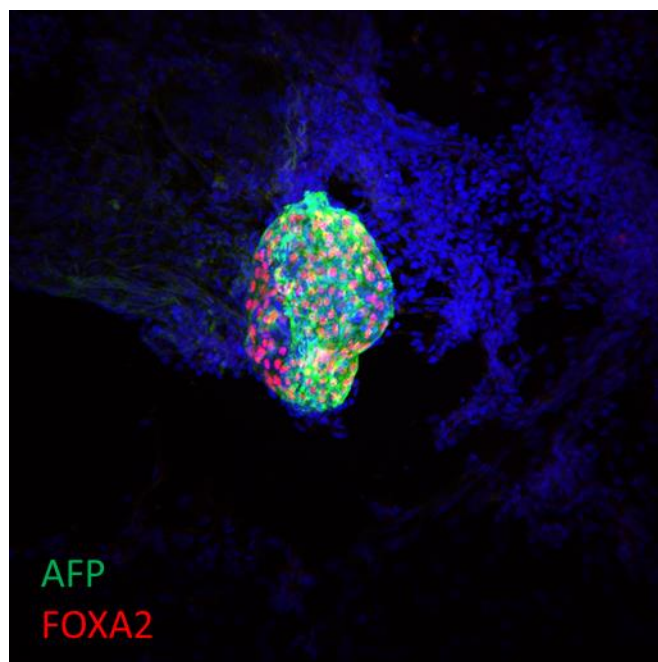
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA**



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 y GFAP**



Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**



Anexo 3

Cariotipo

ESTUDI CITOGENETIC

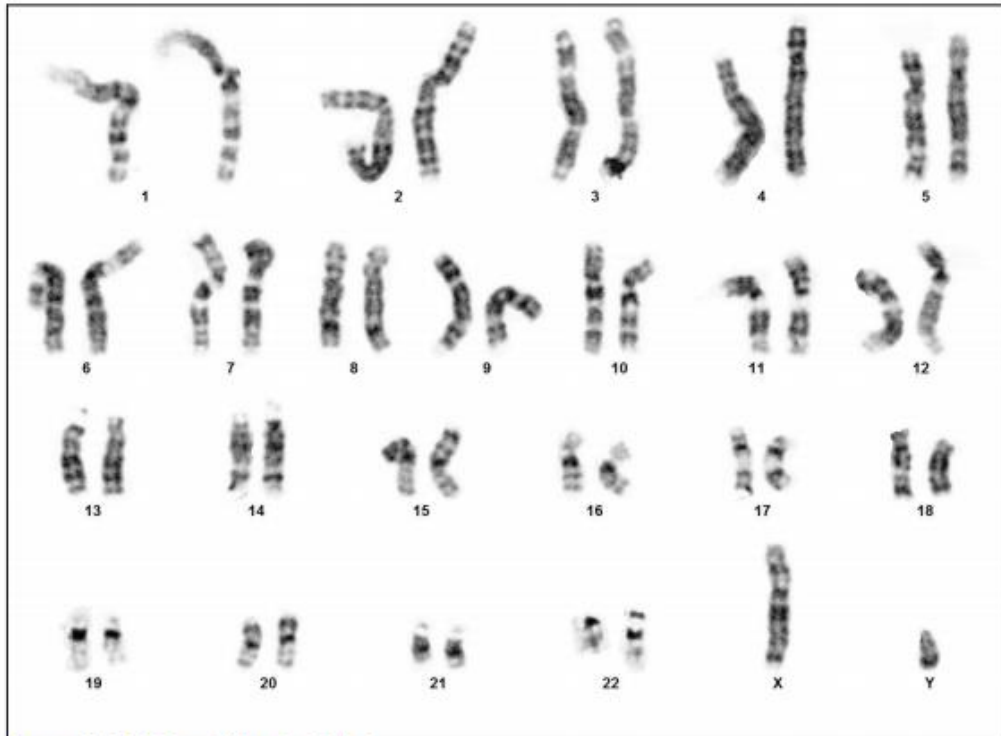
Case name: 00230750

NHC: CT0124

Nombre y Apellidos: Rb20235-C5 p13

Tipo de muestra: CM

Servicio: CMRB



Case: 00230750 Slide: 1 Cell: 3

Resultado: 46,XY



Anexo 4

Resultado microsatélites

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

| Código biobanco | Código origen del ADN de la línea celular | Loci STRs analizados | | | | | | | | | |
|----------------------|---|----------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|------|
| | | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSP1PO | AMEL | vWA | TPOX |
| INVN02520A014ADNA002 | Rb20235-C5 p13 | 6;9,3 | 27;32,2 | 10;11 | 9;12 | 8;9 | 13 | 10;11 | XY | 15;16 | 9;11 |

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

| Código biobanco | Código origen del ADN de la línea celular | Loci STRs analizados | | | | | | | | | |
|----------------------|---|----------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|------|
| | | TH01 | D21S11 | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSP1PO | AMEL | vWA | TPOX |
| INVN02520A018ADNA002 | Rb20235 | 6;9,3 | 27;32,2 | 10;11 | 9;12 | 8;9 | 13 | 10;11 | XY | 15;16 | 9;11 |

Granada, a 23 de Marzo de 2020

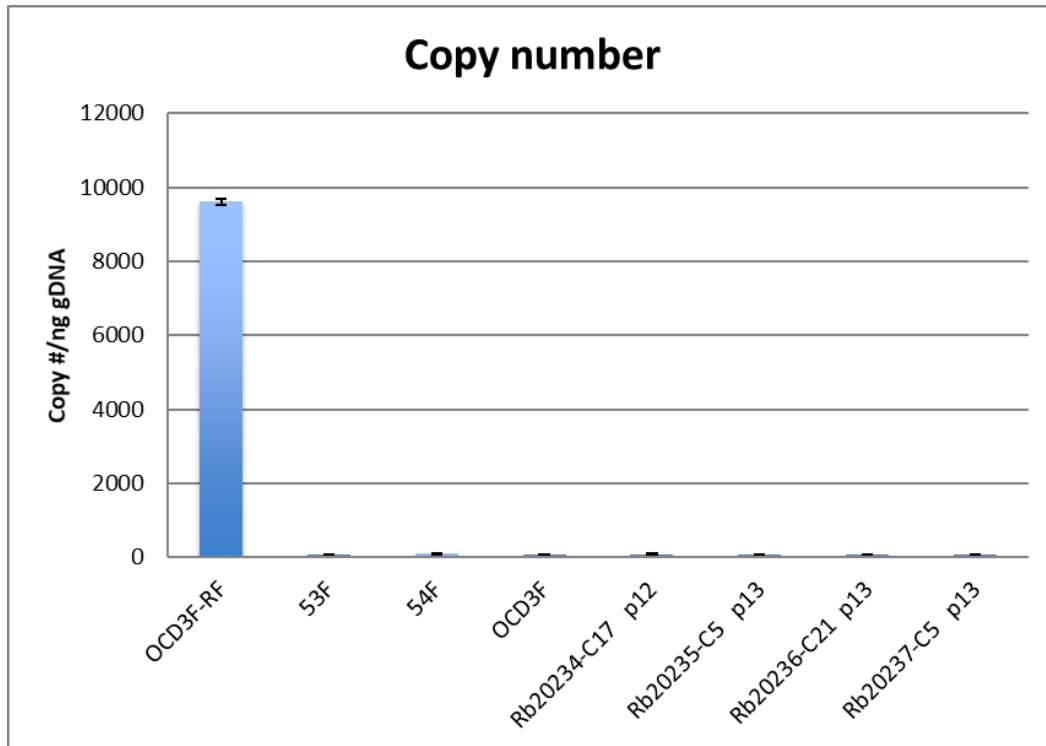
Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en los fibroblastos de los que procede.

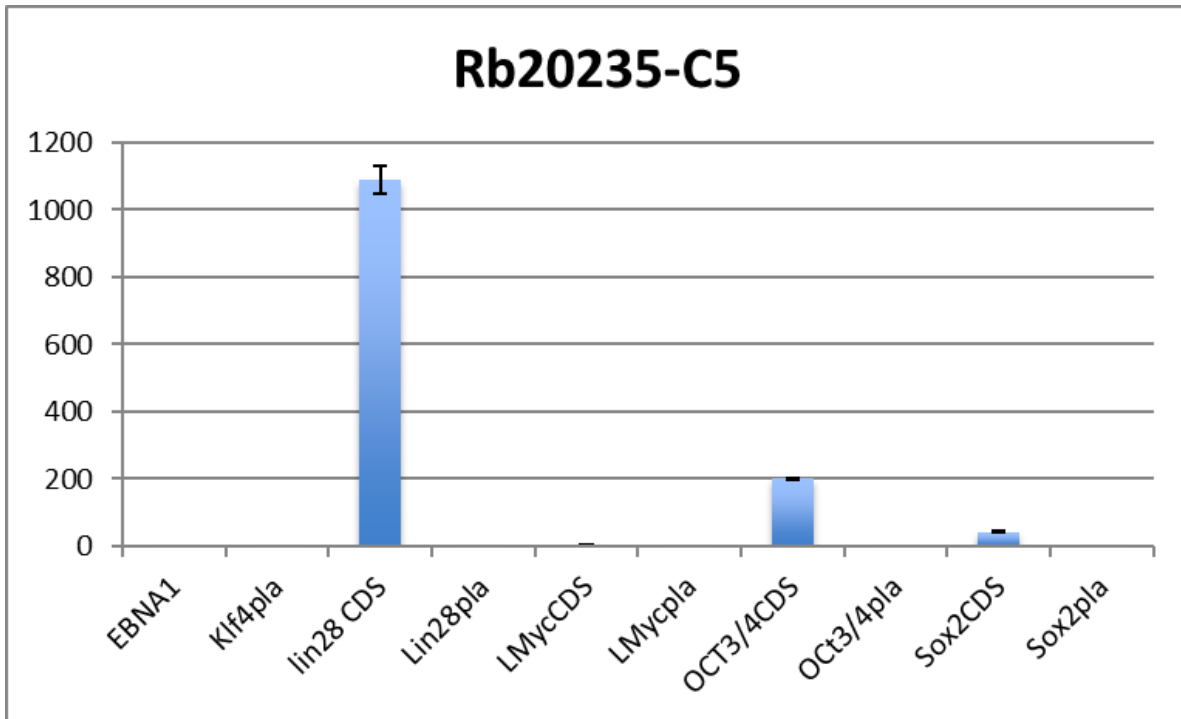


Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea **Rb20235-C5** y en fibroblastos control no-nucleofectados (**53F y 54F**) y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección (**OCD3F-RF**).



Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea **Rb20235-C5**



Anexo 6

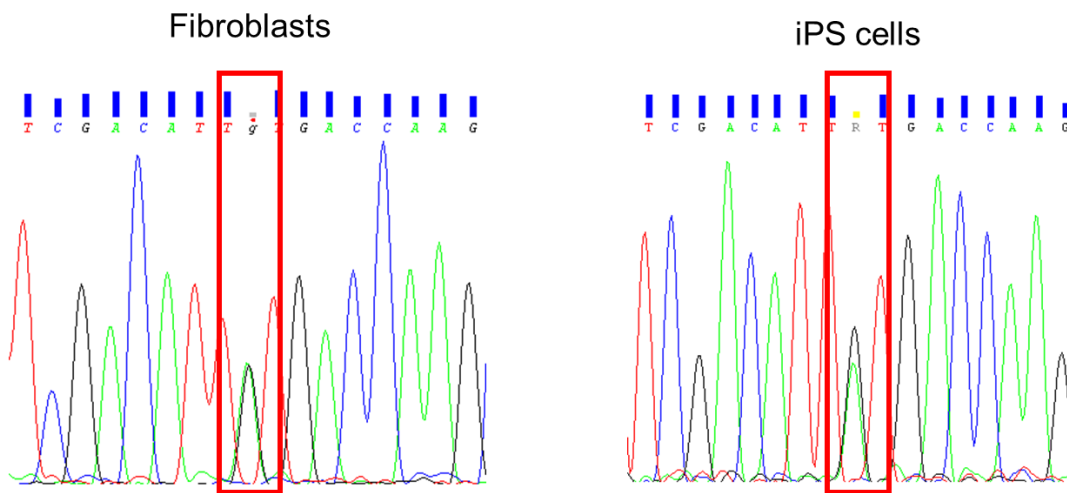
Presencia de la mutación de las células originales

SCN5A gene, exon 27 13 WT

TGAAGAAGCTGGGCTCCAAGAAGCCCCAGAAGCCCATCCCACGGCCCCTGAACAA
 GTACCAGGGCTTCATATTCGACATT**G**TGACCAAGCAGGCCTTTGACGTCACCATC
 ATGTTTCTGATCTGCTTGAATATGGTGACCATGATGGTGGAGACAGATGACCAAA

SCN5A gene, exon 27 Patient BrS Rb20235-C5 (c.4573G>A , in heterozygosis)

TGAAGAAGCTGGGCTCCAAGAAGCCCCAGAAGCCCATCCCACGGCCCCTGAACAA
 GTACCAGGGCTTCATATTCGACATT**G/A**TGACCAAGCAGGCCTTTGACGTCACCA
 TCATGTTTCTGATCTGCTTGAATATGGTGACCATGATGGTGGAGACAGATGACCA



Detalle de la mutación que presentan los fibroblastos del paciente y que coincide con la observada en la línea de iPSC generada



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 15/01/2020

